

令和元年6月7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09464

研究課題名(和文) 転写因子の翻訳後調節による細胞増殖オン・オフの制御

研究課題名(英文) Post-translational modification of transcription factors regulates on-off switch of cell proliferation

研究代表者

峯岸 直子 (Minegishi, Naoko)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授

研究者番号：40271895

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)：血液細胞の増殖を制御する転写因子GATA2と細胞周期制御との関係を解析した。GATA2は、S期に発現が高く、M期にCyclin B1- Cyclin-dependent kinases (CDK) 1によりリン酸化され、F-box/WD repeat -containing protein 7 (Fbw7)と相互作用しユビキチン化分解を受ける。一方、Cyclin-CDK2によるリン酸化とS-phase kinase-associated protein 2 (Skp2)との相互作用も認められ、GATA2の標的配列への結合がG1/S期に上昇しその後低下することとの関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GATA2は多くの造血器腫瘍に発現するほか、GATA2欠損症では前白血病から白血病の発症や、血液・免疫系の細胞の減少による免疫不全状態が報告されている。一方、ユビキチン・プロテアソーム系は造血器腫瘍治療の重要な標的経路であり、本課題の成果を発端として、今後、この経路とGATA2による細胞増殖のより詳細な関係が明らかにされ、これら疾患の病態解明や治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：GATA2 is an essential transcription factor for hematopoiesis. We analyzed the cell-cycle dependent post-translational regulation of this factor. The expression level of GATA2 and its binding to target sequences, were low in early G1 phase, then increased in G1-S transition phase. In the late S phase, GATA2 expression increased but GATA2 binding to its target sequences decreased. In M-phase, Cyclin B1-Cyclin-dependent kinase (CDK)1 phosphorylated T176 residue of GATA2, and induced the interaction with F-box/WD repeat -containing protein 7 (Fbw7) and the ubiquitin-mediated degradation of GATA2. GATA2 was also phosphorylated by Cyclin A/E-CDK2 and interacted with S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2), which is known as a ubiquitin-conjugating enzyme of phosphorylated cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27) in G1-S phase. Thus, GATA2 is under the regulation of cell-cycle specific serine/threonine phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation.

研究分野：血液学、分子生物学

キーワード：血液腫瘍学 転写因子 GATA因子 細胞周期制御 翻訳後調節

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

1. 研究開始当初の背景

転写因子 GATA2 は造血幹細胞/前駆細胞に発現し、血液細胞の増殖制御の鍵を握る因子であるものの、その分子機構については不明の点が多い。また、ユビキチン・プロテアソームを介したタンパク質分解系は、造血器腫瘍の重要な治療標的となっているが、それらと GATA2 との関係についても限られた知見しか得られていない。

申請者は、GATA2 の発現量および標的遺伝子への結合が、細胞周期の G1/S 移行期から S 期にかけて増加し、M 期に減少することを報告した。蛍光蛋白質との融合分子を使った解析により、この発現変動には、GATA2 のジンクフィンガーより N 末側と C 末側に存在する、種を超えて保存された Cyclin-dependent kinase (CDK) リン酸化のコンセンサス配列 (S227, T457) が関わることを示した。GATA2 は、CyclinA2、CDK2、CDK4 と複合体を形成し、GATA2 のセリン/スレオニン残基は、Cyclin A2-CDK2 により試験管内でリン酸化された。このリン酸化は roscovitine (CDK1, CDK2, CDK5, CDK7 を阻害し、CDK4, CDK6 の阻害は弱い) により阻害され、SB203580 (p38 MAP kinase を阻害) による影響を受けなかった。

これらの結果から、GATA2 は、細胞周期の進行に応じて、その複合体の構成を変化させ、リン酸化やユビキチン化などの翻訳後調節を介して、自身の発現量を変化させるとともに、細胞周期制御にも関わっている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本申請研究では、環境要因による細胞周期の開始と停止の機構解明を目指して、GATA2 による細胞増殖の制御機構と、セリン/スレオニン残基リン酸化およびユビキチン・プロテアソーム分解系との関係について検討した。

3. 研究の方法

(1) 方法の多くは引用論文 記載の方法で行なった。

(2) 細胞周期同調培養は、サイミジブロック法 のほか、Ba/F3 細胞株を用い、培地からのサイトカイン除去と再添加により行った。

4. 研究成果

(1) ヒト GATA2 スレオニン残基のリン酸化とユビキチン化依存性分解

浜松医科大学との共同研究により、M 期に発現する Cyclin B1-1Cdk がヒト GATA2 の 176 番目のスレオニン残基 (T176) をリン酸化すると、GATA2 は F-box/WD repeat -containing protein 7 (Fbw7) と相互作用し、SCF-type E3 ligase によるユビキチン化とプロテアソーム依存性分解を受け、発現が消失することを報告した。GATA2 の T176 とその周囲のアミノ酸配列は、Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3) が認識するコンセンサス配列にも一致するが、遺伝子組換え GSK3 は T176 をリン酸化しなかった。

(2) 細胞株同調培養における GATA2 発現の検討

共同研究者 が実施した試験管内リン酸化実験においても、Cyclin A-CDK2、Cyclin E-CDK2 による T176 のリン酸化も弱いながら認められ、我々の結果 と一致したことから、G1-S 期に発現する Cyclin-CDK と GATA2 の関係について、さらに検討を進めた。

サイミジブロック法により細胞周期を同調させた P815 細胞株および臍帯血 CD34 + 細胞において、GATA2 の発現が S 期開始前には低く、S 期に上昇した。内在性 GATA2 の標的遺伝子への結合も、S 期の進行に伴った上昇していた。

そこで、サイトカイン依存性増殖をする proB 細胞株 Ba/F3 細胞を用いた細胞周期同調培養系を構築し、前述のサイミジブロック法とともに検討を行った。また、G1-S 期の変化を詳細に捉えるために、同時に Retinoblastoma protein (RB) のリン酸化 (pRB 795, pRB807/811) をフローサイトメーターによって解析し、Cyclin と GATA2 の発現を解析した。

その結果、免疫プロット法による GATA2 の発現は、細胞周期進行の停止を解除した直後には非常に低く、RB のリン酸化に伴って増加し、細胞 DNA 量の増加に合わせて増加した。一方で、標的遺伝子領域に対する GATA2 の結合は、RB リン酸化が起き始めた時期に多く、S 期が進行すると低下した。また、GATA2 は G1-S 期に発現する Cyclin 遺伝子の調節領域に結合し、その結合は標的遺伝子の mRNA 発現上昇に先駆けて上昇した。

(3) GATA2 と Skp2 との相互作用

GATA2 と同様に、Cyclin A1-CDK2、Cyclin E-CDK2 によってリン酸化を受ける分子としては Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27^{KIP1}) が有名である。P27^{KIP1} は G1 期から S 期への進行を抑制する重要な因子であり、S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) との相互作用を介してユビキチン・プロテオソーム依存性分解を受ける。GATA2 と Skp2 との相互作用について免疫沈降・免疫プロット法により検討したところ、野生型の GATA2 では SKP2 との相互作用とユビキチン化が認められた。一方、CDK によるリン酸化のコンセンサス配列 3 カ所を含む 5 カ所のセリン/スレオニン残基に変異を導入した GATA2 では、Skp2 との相互作用やユビキチン化は認められなかった。

この結果から、GATA2 は G1、S 期にかけても、Cyclin-CDKs によるリン酸化を受け、SKP2 との結合を介してユビキチン・プロテオソーム依存性分解を受けることが示された。

(4) ヒト B 細胞、T 細胞における GATA2, GATA3 発現と機能

GATA2 欠損症(GATA2 遺伝子のハプロタイプ変異を持つ症例)においては、好中球減少症、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群や白血病などの造血幹細胞/前駆細胞、骨髄球系/赤血球系細胞の異常にとどまらず、樹状細胞、単球、B リンパ球、NK 細胞の細胞数減少による免疫不全症 (Immunodeficiency21) を発症する。中でも B リンパ球の減少は頻度の高い症状であり、B リンパ球も GATA2 による直接的な増殖制御を受ける可能性が予想された。

本課題において用いた Ba/F3 細胞は GATA2 を発現するマウス proB 細胞株であり、GATA2 の発現は、対数増殖期にある細胞では検出限界ぎりぎりであるが、S 期特異的に上昇した。また、標的遺伝子への GATA2 結合は増殖刺激添加後、GATA2 発現量が上昇する時期に高かった。また、予備的な検討ではあるが、Epstein-Barr ウィルス感染によるヒト lymphoblastoid cell line においても GATA2 mRNA の発現は検出された。今後は、B 細胞における GATA2 による細胞増殖制御の可能性についても検討する予定である。

(5)本課題では、GATA 2 による細胞増殖制御とユビキチン・プロテアソーム系との関係を明らかにした。この系は造血器腫瘍の重要な治療標的であり、本研究の研究をさらに発展させることにより、造血器腫瘍や GATA 2 欠損症などの病態の理解や予後の改善に役立つことが期待される。

< 引用論文 >

Koga S, Minegishi M, et al. (2007) *Blood*, 109, 4200-4208.

Nakajima T, et al. (2015) *J Biol Chem*, 290,10368-130381. (発表論文の 25)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

1. Yasuda J, Katsuoka F (3/52), Minegishi N (38/52), et al. (2019) Genome analyses for the Tohoku Medical Megabank Project towards establishment of personalized healthcare. *J Biochem*, 査読あり 165, 139-58. doi:10.1093/jb/mvy096
2. Sugawara J, Katsuoka F (14/29), Minegishi N (20/29), et al. (2019) Maternity Log study: a longitudinal lifelog monitoring and multiomics analysis for the early prediction of complicated pregnancy. *BMJ Open*, 査読あり 9, e025939. doi:10.1136/bmjopen-2018-025939
3. Mimori T, Minegishi N (17/21), et al. (2019) Construction of full-length Japanese reference panel of class I HLA genes with single-molecule, real-time sequencing. *Pharmacogenomics J*, 査読あり 19, 136-46. doi:10.1038/s41397-017-0010-4.
4. Shido K, Minegishi N (7/12), et al. (2018) Susceptibility loci for tanning ability in the Japanese population identified by a genome-wide association study from the Tohoku Medical Megabank Project Cohort Study. *J Invest Dermatol*, 査読あり 13, S51. doi:10.1016/j.jid.2019.01.015
5. Shibuya Y, Katsuoka F (5/11), et al. (2018) Identification of somatic genetic alterations in ovarian clear cell carcinoma with next generation sequencing. *Genes Chromosomes Cancer*, 査読あり 57, 51-60. doi:10.1002/gcc.22507
6. Kabe Y, Minegishi N (11/16), et al. (2018) Development of a highly sensitive device for counting the number of disease-specific exosomes in human sera. *Clin Chem*, 査読あり 64, 1463-1473. doi:10.1373/clinchem.2018.291963
7. Watanabe T, Minegishi N (12/17), et al. (2018) Functional characterization of 40 CYP2B6 allelic variants by assessing efavirenz 8-hydroxylation. *Biochem Pharmacol*, 査読あり 156, 420-430. doi:10.1016/j.bcp.2018.09.010
8. Koshiba S, Katsuoka F (7/21), Minegishi N (11/21), et al. (2018) Omics research project on prospective cohort studies from the Tohoku Medical Megabank Project. *Genes Cells*, 査読あり 23, 406-417. doi:10.1111/gtc.12588
9. Malik R, Minegishi N (347/425), et al. (2018) Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. *Nat Genet*, 査読あり 50, 524-537. doi:10.1038/s41588-018-0058-3
10. Kumondai M, Minegishi N (11/17), et al. (2018). Development and application of a rapid and sensitive genotyping method for pharmacogene variants using the single-stranded tag hybridization chromatographic printed-array strip (STH-PAS). *Drug Metab Pharmacokinet*, 査読あり 33, 258-263. doi:10.1016/j.dmpk.2018.08.003
11. Yamaguchi-Kabata Y, Katsuoka F (10/30), Minegishi N (24/30), et al. (2018) Evaluation of reported pathogenic variants and their frequencies in a Japanese population based on a whole-genome reference panel of 2049 individuals. *J Hum Genet*, 査読あり 63, 213-230. doi:10.1038/s10038-017-0347-1

12. 峯岸 直子(1/1). (2018) 疾患データベースとバイオバンクの現状と動向. ヒト疾患のデータベースとバイオバンク 第2章 疾患データベースとバイオバンク [プロジェクトの最前線と利用の実践ガイド], *実験医学増刊*, 査読なし 35, 2845-2850. ISBN 978-4-7581-0366-4
13. Akiyama M, Minegishi N (18/22), et al. (2017) Genome-wide association study identifies 112 new loci for body mass index in the Japanese population. *Nat Genet*, 査読あり 49, 1458-1467. doi:10.1038/ng.3951
14. Takai-Igarashi T, Minegishi N (10/21), et al. (2017) Security controls in an integrated biobank to protect privacy in data sharing: rationale and study design. *BMC Med Inform Decis Mak*, 査読あり 17, 100. doi:10.1186/s12911-017-0494-5
15. Hirano I, Minegishi N (5/7), et al. (2017) Renal anemia model mouse established by transgenic rescue with an erythropoietin gene lacking kidney-specific regulatory elements. *Mol Cell Biol*, 査読あり 37, e00451-16. doi:10.1128/MCB.00451-16
16. Hachiya T, Minegishi N (22/41), et al. (2017) Genetic predisposition to ischemic stroke: A polygenic risk score. *Stroke*, 査読あり 48, 253-258. doi:10.1161/STROKEAHA.116.014506
17. Yu L, Katsuoka F (4/10), et al. (2017). Derepression of the DNA methylation machinery of the *Gata1* gene triggers the differentiation cue for erythropoiesis. *Mol Cell Biol*, 査読あり 37, e00592-16. doi:10.1128/mcb.00592-16
18. Pan X, Katsuoka F (6/22), et al. (2017). Monitoring of minimal residual disease in early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia by next-generation sequencing. *Br J Haematol*, 査読あり 176, 318-321. doi:10.1111/bjh.13948
19. Katayama S, Katsuoka F (5/9), et al. (2017) GATA2 haploinsufficiency accelerates EVI1-driven leukemogenesis. *Blood*, 査読あり 130, 908-919. doi:10.1182/blood-2016-12-756767
20. Koshihara S, Katsuoka F (9/31), Minegishi N(19/31), et al. (2016) The structural origin of metabolic quantitative diversity. *Sci Rep*, 査読あり 6, 31463. doi:10.1038/srep31463
21. Kuriyama S, Minegishi N (29/56), et al. (2016) The Tohoku Medical Megabank Project: Design and mission. *J Epidemiol*, 査読あり 26, 493-511. doi:10.2188/jea.JE20150268
22. Shiwa Y, Minegishi N (11/23), et al. (2016) Adjustment of cell-type composition minimizes systematic bias in blood DNA methylation profiles derived by DNA collection protocols. *PLoS ONE*, 査読あり 11, e0147519. doi:10.1371/journal.pone.0147519,
23. Uruno A, Katsuoka F (3/9), et al. (2016) Nrf2-mediated regulation of skeletal muscle glycogen metabolism. *Mol Cell Biol*, 査読あり 36, 1655-1672. doi:10.1128/mcb.01095-15
24. Nagasaki M, Katsuoka F (3/29), Minegishi N (24/29), et al. (2015) Rare variant discovery by deep whole-genome sequencing of 1,070 Japanese individuals. *Nature Commun*, 査読あり 6, 8018. doi:10.1038/ncomms9018
25. Nakajima T, Minegishi N (7/13), et al. (2015) Regulation of GATA binding protein 2 levels via ubiquitin-dependent degradation by Fbw7: involvement of cyclin B-cyclin-dependent kinase 1-mediated phosphorylation of Thr176 in GATA binding protein 2. *J Biol Chem*, 査読あり 290, 10368-10381. doi:10.1074/jbc.M114.613018
26. Nishikawa K, Katsuoka F (4/11), et al. (2015). DNA methyltransferase 3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosylmethionine-producing metabolic pathway. *Nat Med*, 査読あり 21, 281-287. doi:10.1038/nm.3774
27. Kimura M, Katsuoka F (8/12), et al. (2015). Molecular basis distinguishing the DNA binding profile of Nrf2-Maf heterodimer from that of Maf homodimer. *J Biol Chem*, 査読あり 290, 10644. doi:10.1074/jbc.A115.706863

[学会発表](計21件)

1. Ishida N, Minegishi N (8/8), et al. Processing, storage and management systems of cell samples in TMM biobank. Europe Biobank Week 2018, 2018, 口頭
2. 峯岸 直子. TMM バイオバンクの試料・情報利活用における課題. The 4th Radiation Effects Research Foundation Workshop— Ethical considerations required in collaborative studies involving biosamples, 2018, 口頭
3. 峯岸 直子. 東北メディカル・メガバンク(TMM)バイオバンクの品質管理: 標準化は連携を促進する. バイオバンクの品質管理・標準化 公開ワークショップ, 2018, 口頭
4. Minegishi N. Baseline collection and the 2nd stage activity of TMM Biobank. 2nd Karolinska-Tohoku Joint Symposium on Medical Science, 2017, 口頭
5. Nishijima I, Minegishi N (17/17), et al. Quality management of TMM biobank, population-based biobank in Japan. Global Biobank Week Meeting, 2017, ポスター
6. Minegishi N (1/28), et al. Contribution of a population-based biobank to improving the

- health status of the Japanese population. International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER) 2017 Annual Meeting & Exhibits, 2017, ポスター
7. Kudo H, Minegishi N (17/17), et al. Evaluation of biobank sample correctness and integrity in TMM Biobank. ISBER 2017 Annual Meeting & Exhibits, 2017, ポスター
 8. Minegishi N (1/1). Experience as the public population-based biobank in the disaster-stricken areas in Japan. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease, 2017, 口頭
 9. 峯岸 直子. メガバンク計画バイオバンクの保存試料とその利用について. 日本クロマトグラフィー学会, 2017, 口頭
 10. Kudo H, Katsuoka F (11/17), Minegishi N (15/17), et al. Reliability of ID management in a Japanese population-based biobank. Europe Biobank Week, Biobanking for Health Innovation, 2016, ポスター
 11. Minegishi N (1/11), et al. TMM Biobank, an integrated population-based biobank, as a part of the reconstruction project after tsunami disaster. Europe Biobank Week, Biobanking for Health Innovation, 2016, ポスター
 12. Minegishi N (1/7), et al. TMM biobank preparing for the 2nd stage program. NHRI-ToMMo Conference Genomics, Biobanking, and Medical informatics for Precision Medicine, 2016, 口頭
 13. 峯岸 直子. 東北メディカル・メガバンクの目標と進捗状況について. 放射線影響研究所ワークショップ, 2016, 口頭
 14. Minegishi N (1/1). The biobank of Tohoku Medical Megabank Organization. NHRI-ToMMo Conference, Genomics, biobanking, and Learning Health Systems, 2015, 口頭
 15. Nobukuni T, Minegishi N (10/10), et al. Towards establishing a good biobanking system, survey on utilization of resources. European and Middle Eastern Society for Biopreservation and Biobanking (ESBB) LONDON 2015, 2015, 口頭
 16. Saigasa D, Minegishi N (4/10), et al. Availability of records on blood collection and transportation influences reliability of omics analysis. HANDSON BIOBANK 2015, 2015, ポスター
 17. Kudo H, Katsuoka F (7/11), Minegishi N (10/11), et al. Assessment of ID integrity with ABO blood typing from questionnaire to genomic data in Japanese biobank: ToMMo. ISBER 2015 Annual meeting and exhibit, 2015, ポスター
 18. Minegishi N. ToMMo biobank system for ensuring the quality and accuracy of biospecimens. A Health Informatics Infrastructure for a New Era, The Learning Health System & Tohoku Medical Information Highway, 2015, 口頭
 19. 峯岸 直子. 東北メディカル・メガバンクの現状と今後の展望. 日本脳科学関連学会連合主催「脳科学の新しい推進プログラムに関する検討会」, 2015, 口頭
 20. 峯岸 直子. 東北メディカル・メガバンク機構のバイオバンクの管理体制. 放射線影響研究所ワークショップ, 2015, 口頭
 21. 峯岸 直子. 宮城・岩手両県の健常人コホート研究の基盤となるバイオバンク構築の現状と今後. 第1回ヒト生体試料科学研究会シンポジウム, 2015, 口頭

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：勝岡 史城

ローマ字氏名：(KATSUOKA, fumiki)

所属研究機関名：東北大学

部局名：東北メディカル・メガバンク機構

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30447255

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。