

令和元年6月18日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09857

研究課題名(和文) 転写ネットワーク解析によるRunx1の造血制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of hematopoietic transcription factor RUNX1 through the transcription network analyses

研究代表者

忠垣 憲次郎 (TADAGAKI, KENJIRO)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30416268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：RUNX1は造血幹細胞の発生制御に係る転写因子であるがその分子機構は十分には解明されていない。当研究では標的遺伝子の探索による当命題解明への寄与を試みた。RUNX1欠損ES細胞の解析から3種の新規標的遺伝子候補を選び出したところ、いずれもRUNX1/CBF存在下でそのプロモータが活性化された。このうち2種で、RUNX1の結合をクロマチン免疫沈降法によって確認した。さらに、RUNX1の強制発現系とsiRNAによるノックダウン系の両者を用いて、これら2種の遺伝子発現が確かにRUNX1依存性であることを細胞レベルで確認した。以上から、この2種はRUNX1の新規標的遺伝子であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RUNX1は造血幹細胞の発生制御のみならず、血小板産生やT細胞分化においても中心となる働きを担う転写因子である。本研究によって、これまで知られていなかった2つの標的遺伝子を新規に特定することに成功した。これはRUNX1作用の分子メカニズムの理解を一步進めるものと考えている。また、これらの分子はいずれも造血・免疫系に関与することが知られていることから、今後、これらの遺伝子群の生物作用の詳細や、RUNX1との機能協調の詳細解析へと研究が展開するものと期待される。こうした研究によって、造血の分子メカニズムの詳細解明やRUNX1機能異常に関わるヒト疾患の新規治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanism of the regulation of hematopoietic stem cells, we focused on the identification of the novel transcriptional targets of hematopoietic transcription factor RUNX1. Although many target genes have so far been identified, a number of important targets should still remain to be elucidated. We have selected three candidate genes through array-analysis of the RUNX1-deficient murine ES cells that have been described for hematopoietic regulation. We found that RUNX1 regulated the promoter activity of all these three genes detected by luciferase reporter assay experiments. ChIP assay showed that RUNX1 bound to the RUNX1-binding sequence(s) in the cis-regulatory sequences of the two candidate genes of the three. In addition, the message levels of these genes were regulated depending on the RUNX1 status in the cell-level experiments. Thus, the two genes of the three candidate genes should be the novel transcriptional target genes of RUNX1.

研究分野：分子生物学 腫瘍学 血液学 免疫学

キーワード：造血幹細胞 転写因子 RUNX1 標的遺伝子

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

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞はすべての系統の血球に分化する多分化能と自己複製能を併せ持つ細胞であり、細胞療法の標的細胞として今後の臨床応用が期待されるものの、その制御の分子機構には不明な点が多く残されている。造血関連転写因子である RUNX1 は、造血幹細胞の初期発生や成体での血小板造血や維持にとって必須の転写因子であり、白血病発症における遺伝子変異の標的となり、時空特異的に機能し、幹細胞制御に関わる重要な標的遺伝子群の発現を調節する。RUNX1 には既に多くの標的遺伝子群が知られているが、その多彩な生物作用を十分に説明できるだけの標的遺伝子は、必ずしも特定できていないのが現状である。

筆者らは、RUNX1 を介した造血発生・分化制御の分子メカニズムを解明するために、造血幹細胞分化に関わる RUNX1 の新規標的遺伝子の同定を目的に研究を進め、新規候補遺伝子群を既に複数分離していた。そこで、これらの新規候補遺伝子群が RUNX1 の新規標的遺伝子であるかどうかを分子生物学的手法を用いて解析し、さらにその候補遺伝子群と RUNX1 との協調機能の解析することで、未だ不明な点が多く残されている造血幹細胞の形成・自己複製・分化や血液細胞の産生の分子機構の詳細を解明しようと考えた。

2. 研究の目的

上述した背景のもと、造血制御に関与する RUNX1 転写因子の標的遺伝子を新規に同定し、その標的遺伝子と RUNX1 との協調機能を解析することで、RUNX1 の造血幹細胞発生制御、血小板産生、そして T 細胞分化に関わる分子機構の解明することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞培養

HeLa 細胞は 10% fetal bovine serum と 2mmol/L glutamine を添加した DMEM(Wako) で培養した。K562 細胞と Jurkat 細胞は 10% fetal bovine serum と 2mmol/L glutamine を添加した RPMI 1640(Wako) で培養した。各細胞は、37℃、5%CO₂にて培養した。

ルシフェラーゼアッセイによる転写制御解析

細胞に Lipofectamine2000(Thermo Fisher Scientific)を用いて、レポータープラスミドと発現プラスミドをトランスフェクションした。48 時間後に細胞抽出液を調整し、dual-luciferase reporter assay(Promega)を用いて転写活性を測定した。

クロマチン免疫沈降法

K562 細胞にホルマリン固定を行い、その後細胞から DNA を抽出した。超音波処理により DNA を断片化し、RUNX1 抗体による免疫沈降を行った。得られた DNA 断片と特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR(Toyobo)を行い、RUNX1 と相互作用している DNA 領域を解析した。

遺伝子発現解析

細胞から Total RNA を ISOGEN(Nippon gene)により抽出し、SuperScript IV(Thermo Fisher Scientific)を用いて cDNA を精製した。特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR(Toyobo)を行い、各遺伝子の発現を定量化した。

4. 研究成果

(1) ルシフェラーゼアッセイによる転写制御解析

3 種の候補標的遺伝子のプロモーター領域について *in silico* 解析で RUNX1 結合部位の存在の有無を調べた結果、それぞれに存在することが確認された。そこで、RUNX1 による転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにて検討した。候補標的遺伝子のプロモーター領域とされる RUNX1 結合部位を含む転写開始点上流に位置する DNA 断片をクローニングし、それぞれのプロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入することによってレポーターベクターを作製した。次いで、24 well plate に播種した HeLa 細胞に対し、リポフェクション法により RUNX1 発現プラスミドと各ルシフェラーゼベクターを導入し、48 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、RUNX1 の発現により 3 種の候補標的遺伝子の転写は正に活性化されることが確認できた。

次に、これら 3 種の候補標的遺伝子の転写がどのようなメカニズムによって RUNX1 による制御を受けるのか検討を進めた。RUNX1 コンセンサス配列に結合しない一連の変異型 RUNX1 の発現ベクターと RUNX1 結合部位に変異を施した変異型ルシフェラーゼベクターを利用し、RUNX1 転写因子の候補遺伝子プロモーター領域に対する作用について解析した。まず、RUNX1 コンセンサス部位に結合しない変異型 RUNX1 を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、3 種とも候補標的遺伝子の転写は活性化されなかった。くわえて転写活性化ドメインを欠く RUNX1 変異体をもちいて同様の検討を行なったが、ここでもプロモーターの活性化は観察され

なかった。さらに、候補遺伝子プロモーター領域にある RUNX1 結合配列に変異を導入して RUNX1 が結合できない変異体プロモーターを作製した。これらのプラスミドと上述の RUNX1 変異体とのさまざまな組み合わせを用いて、ヒト血球系培養細胞中の転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにて検討した。その結果、3種の候補標的遺伝子の変異型ルシフェラーゼベクターのいずれも RUNX1 によって正方向に活性化された。次に、RUNX1 コンセンサス部位に結合しない変異型 RUNX1 を用いて同様にルシフェラーゼアッセイを行うと、3種とも候補標的遺伝子の転写は活性化されなかった。くわえて転写活性化ドメインを欠く RUNX1 変異体を用いた同様の検討を行なったが、ここでもプロモーターの転写活性化は観察されなかった。このことから、3種のこうした転写調節は、RUNX1 による直接的なものではなく、RUNX1 と他の転写因子群との協調による可能性が示唆された。

(2) クロマチン免疫沈降法による解析

候補標的遺伝子のプロモーター領域の RUNX1 結合部位付近に RUNX1 が結合しているかを確認するために、クロマチン免疫沈降法を行った。ヒト慢性骨髄性白血病由来の K562 細胞に対し、RUNX1 抗体で免疫沈降させた DNA 断片を鋳型としてリアルタイム PCR を行い、相対定量比較を行った。その結果、3種のうち2種の候補標的遺伝子でコントロール領域と比較して RUNX1 結合部位付近で顕著な RUNX1 の結合を認めた。

(3) RUNX1 による標的遺伝子発現の変化

候補標的遺伝子発現が RUNX1 により制御されているかを確認した。RUNX1 とその共役因子の CBF を強制発現させた K562 細胞及び siRNA で RUNX1 をノックダウンさせた K562 細胞から Total RNA を ISOGEN により抽出し、SuperScript IV を用いて cDNA を精製した。特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、各遺伝子発現の相対定量比較を行った。その結果、3種のうち2種の候補標的遺伝子の発現が RUNX1 により変化していることを確認することができた。Jurkat 細胞を用いた場合でも同様の結果が得られた。

本研究によって、これまで知られていなかった転写因子 RUNX1 の2つの標的遺伝子を新規に特定することに成功した。これは RUNX1 作用の分子メカニズムの理解を一步進めるものと考えている。また、これらの分子はいずれも造血・免疫系に関与することが知られていることから、今後、これらの遺伝子群の生物作用の詳細や、RUNX1 との機能協調の詳細解析へと研究が展開するものと期待される。こうした研究によって、造血の分子メカニズムの詳細解明や RUNX1 機能異常が関わるヒト疾患の新規治療法の開発に貢献することが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Sokolina K, Kittanakom S, Snider J, Kotlyar M, Maurice P, Gandía J, Benleulmi-Chaachoua A, Tadagaki K, Oishi A, Wong V, Maly RH, Deineko V, Aoki H, Amin S, Yao Z, Morató X, Otasek D, Kobayashi H, Menendez J, Auerbach D, Angers S, Pržulj N, Bouvier M, Babu M, Ciruela F, Jockers R, Jurisica I, Stagljar I. Systematic protein-protein interaction mapping for clinically relevant human GPCRs. *Mol Syst Biol.* 2017 Mar 15;13(3):918. DOI : 10.15252/msb.20167430. 査読有

Wojciech S, Ahmad R, Belaid-Choucair Z, Journe AS, Gallet S, Dam J, Daulat A, Ndiaye-Lobry D, Lahuna O, Karamitri A, Guillaume JL, Do Cruzeiro M, Guillonéau F, Saade A, Clement N, Courivaud T, Kaabi N, Tadagaki K, Delagrangé P, Prevot V, Hermine O, Prunier C, Jockers R.

The orphan GPR50 receptor promotes constitutive TGF receptor signaling and protects against cancer development.

Nature Communications. 2018 Mar 23;9(1):1216.

DOI:10.1038/s41467-018-03609-x. 査読有

Clement N, Renault N, Guillaume JL, Cecon E, Journé AS, Laurent X, Tadagaki K, Cogé F, Gohier A, Delagrangé P, Chavatte P, Jockers R.

Importance of the second extracellular loop for melatonin MT1 receptor function and absence of melatonin binding in GPR50.

Br J Pharmacol. 2018 Aug;175(16):3281-3297.

DOI : 10.1111/bph.14029. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

忠垣憲次郎、山崎健太、栗原康道、吉田達士、奥田司

RUNX1/AML1 転写因子の新規候補標的遺伝子の解析

第 64 回日本生化学会近畿支部例会 (豊中) (2017 年 5 月 27 日)

Kenjiro Tadagaki, Yasumichi Kuwahara, Tatsushi Yoshida, Tsukasa Okuda.

An array-based approach for novel RUNX1(AML1)-target genes.

第 76 回日本癌学会 (横浜)(2017 年 9 月 29 日)

Kenjiro Tadagaki, Kenta Yamasaki, Yasumichi Kuwahara, Tatsushi Yoshida, Tsukasa Okuda.

Candidate target genes of hematopoietic transcription factor RUNX1 (AML1).

第 79 回日本血液学会 (東京)(2017 年 10 月 21 日)

Kenjiro Tadagaki, Kenta Yamasaki, Noriko Kondo, Yasumichi Kuwahara, Tatsushi Yoshida, Tsukasa Okuda.

Analysis of a novel candidate target gene of the hematopoietic transcription factor RUNX1 (AML1).

第 80 回日本血液学会 (大阪)(2018 年 10 月 13 日)

忠垣憲次郎、山崎健太、近藤則子、栗原康通、吉田達士、奥田司

造血関連転写因子 RUNX1(AML1)の新規転写標的候補遺伝子の探

第 41 回日本分子生物学会 (横浜)(2018 年 11 月 28 日)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 奥田 司

ローマ字氏名 : (OKUDA, Tsukasa)

所属研究機関名 : 京都府立医科大学

部局名 : 大学院医学研究科

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 30291587

(2)研究協力者

なし